ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2021, том 68, № 4, с. 392–401

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – ПРОДУЦЕНТА ИЗОФЛАВОНОИДОВ

© 2021 г. М. В. Титова[a, *], Д. В. Кочкин[a, b], А. А. Фоменков[a], И. М. Иванов[a], Е. А. Котенкова[c], Г. Л. Кочарян[d], Э. Г. Дживишев[e], Н. П. Мехтиева[e], Е. В. Попова[a], А. М. Носов[a, b]

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия*

[b]*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

[c]*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Москва, Россия*

[d]*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия*

[e]*Институт ботаники Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан*

**e-mail: titomirez@mail.ru*

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.
После доработки 02.10.2020 г.
Принята к публикации 10.10.2020 г.

Впервые получена суспензионная культура клеток верблюжьей колючки *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse и исследованы ее ростовые характеристики при выращивании в различных системах (колбы и барботажные биореакторы с рабочим объемом 15 л). Показано, что полученная культура характеризуется достаточно интенсивным ростом (накопление сухой биомассы – 15–20 г/л, индекс роста – 11–16, удельная скорость роста – 0.15 ± 0.01 сут$^{-1}$), при этом ростовые характеристики при выращивании исследуемой культуры в биореакторах незначительно отличались от таковых при выращивании в колбах. Проведено предварительное изучение качественного состава вторичных метаболитов в биомассе данной культуры клеток, выращенной в колбах, с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (УЭЖХ ЭР МС). Показано наличие изофлавонов различных структурных групп: свободные изофлавоны (изомер афформозина), глюкозиды изофлавонов (глюкозиды каликозина и формононетина) и ацилированные глюкозиды изофлавонов (малонил-глюкозиды каликозина, формононетина, генистеина и изомера афформозина). Экстракты из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращенной в колбах, были протестировны на антимикробную активность. В качестве тест-культур использовали культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Было показано, что экстракты проявляли специфическую антимикробную активность по отношению к *S. aureus*, однако не проявляли ее по отношению к *P. aeruginosa*. Таким образом, полученная культура клеток *A. persarum* является перспективным объектом для дальнейшего изучения и потенциального использования в качестве альтернативного источника растительного сырья и характерных для данного вида биологически активных соединений.

Ключевые слова: культура клеток *in vitro*, суспензионная культура клеток, изофлавоны, антимикробная активность, эндемичные и редкие виды растений, *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse

DOI: 10.31857/S0015330321040205

ВВЕДЕНИЕ

Различные виды верблюжьей колючки *Alhagi* spp. традиционно используются в восточной народной медицине в составе лекарственных средств для лечения ревматизма, бронхита, астмы, гастроэнтерита и язвы, заболеваний печени, мочевыводящих путей и желчного пузыря [1–4]. Недавние *in vivo* и *in vitro* исследования биологической активности растений рода *Alhagi* spp. выявили антибактериальный, противогрибковый, антиоксидантный, антипролиферативный и спазмолитический эффекты [5–8]. Известно применение экстрактов *Alhagi* spp. как косметических ингредиентов при лечении гиперпигментации кожи. Кроме того, растения рода *Alhagi* spp. представляют особый интерес как потенциальный компонент функциональных продуктов питания и кормов благодаря высокому содержанию легко перевариваемого

белка в сочетании с другими эссенциальными питательными элементами и минералами [9, 10]. Из различных органов растений *Alhagi* spp. были выделены и идентифицированы вторичные метаболиты, относящиеся к различным классам природных соединений, а именно: фенольные соединения (фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, проантоцианидины, ксантоны, кумарины, гидролизуемые танины, дифениловые эфиры и нафтохиноны), алкалоиды (арилэтиламины, производные пиррола, изохинолиновые алкалоиды), тритерпеновые соединения, сахара, витамины C, K и группы B и некоторые другие [11]. Таким образом, растения данного рода представляют собой интересный объект как для изучения биосинтеза биологически активных вторичных метаболитов, так и для более широкого использования в фармакологии и ветеринарии.

В качестве объекта исследования использовали эндемика Средней Азии верблюжью колючку персидскую, *A. persarum* Boiss. et Buhse (принятое название *Alhagi maurorum* Medik.), известную своими лекарственными свойствами и высоким содержанием биологически активных веществ, в том числе флавоноидов [11]. В настоящей работе исследовали возможность получения суспензионной культуры клеток *A. persarum* в качестве альтернативного источника растительного сырья и характерных для этого вида биологически активных веществ.

Считается, что культивируемые *in vitro* клетки высших растений обладают рядом преимуществ при использовании как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях в области физиологии и биохимии растений, цитологии, биоинженерии [12]. Однако публикаций по получению и изучению культур клеток и тканей *Alhagi* spp. сравнительно немного. Определенную сложность при анализе публикаций, посвященных верблюжьей колючке, представляет высокая степень ее полиморфизма, и как следствие – разночтение в определении ее видовой принадлежности. Известен ряд синонимов для вида *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse, включая *A. camelorum* Fisch.; *A. pseudalhagi* (M. Bieb.) Fisch.; *A. pseudalhagi* subsp. persarum (Boiss. et Buhse) Takht.; *Hedysarum alhagi* L.; *H. pseudalhagi* M. Bieb.; *A. maurorum* Medik. subsp. maurorum; *A. camelorum* var. spinis-elongatis Boiss. Разночтения видовой принадлежности обусловлены наблюдаемыми различиями по высоте, размеру плодов и характеру ветвления побегов в зависимости от состава почвы и климатических условий произрастания.

Согласно литературным данным, впервые культура тканей верблюжьей колючки с высокой регенеративной способностью была получена Bharal и Rashid для *A. camelorum* [13]. Позже был выполнен ряд работ по микроклональному размножению, получению каллусных культур клеток, культур “бородатых” корней и регенерантов для других видов, в частности *A. graecorum* [14]. В литературе, однако, практически отсутствуют данные о подробном изучении соединений вторичного метаболизма в культурах тканей и органов *Alhagi* spp. *in vitro*. В части публикаций представлены данные только по общему содержанию белков, фенольных соединений, липидов и аминокислот [14, 15].

Целью данной работы являлось получение суспензионной культуры клеток верблюжьей колючки персидской, *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse, изучение ее ростовых характеристик при выращивании в различных системах (колбах и биореакторах), а также изучение содержания биологически активных веществ и оценка антимикробной активности экстрактов полученной клеточной биомассы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и выращивание суспензионной культуры клеток. Суспензионная культура клеток *A. persarum* Boiss. et Buhse (синоним *Alhagi maurorum* Medik.) была получена из каллусной линии Ap1-207, инициированной из гипокотиля стерильных проростков *in vitro* этого вида [16].

Получение и выращивание суспензионной культуры клеток проводили на среде с минеральной основой по B5 [17] с добавлением сахарозы, α-нафтилуксусной кислоты, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 6-бензиламинопурина. Культивирование в колбах осуществляли в климатической камере на орбитальном шейкере в темноте при температуре 26–27°C, влажности 70–75% и скорости вращения 95–100 об/мин. Используемые в работе колбы и инструменты стерилизовали в течение 60 мин при 180°C в сухожаровом шкафу.

Для аппаратурного выращивания использовали барботажный соплоконусный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН; точечное аэрирующее устройство; общий объем – 20 л; рабочий объем – 15 л). Выбор типа биореактора был основан на проведенных ранее работах, в которых было показано, что наименьшее стрессовое воздействие на клетки оказывают барботажные ферментеры V-типа, в которых перемешивание суспензии осуществляется за счет потока стерильного воздуха, подаваемого в аппарат под давлением [18, 19]. Концентрацию растворенного кислорода (pO_2) поддерживали на уровне 10–40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Для уменьшения отрицательного воздействия перемешивания на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость потока воздуха по отсутствию седиментации клеток. В период экспоненциального роста скорость увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень поврежде-

ния определяли микроскопически). Температуру суспензии в аппарате поддерживали на уровне 26–27°C.

Цикл субкультивирования для суспензионной культуры в колбах и в биореакторе составлял 14 сут.

Определение ростовых характеристик суспензионной культуры клеток. Характеристику полученной суспензионной культуры клеток проводили путем измерения в процессе культивирования следующих основных параметров: содержание сухой и сырой биомассы, жизнеспособность культуры [20].

Для определения содержания сырой биомассы в литре среды, фиксированный объем суспензии (не меньше 15 мл) фильтровали через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера под вакуумом, промывали дистиллированной водой и взвешивали. Для определения содержания сухой биомассы, биомассу высушивали до постоянного веса в токе воздуха с температурой 40–50°C. Показатели снимали в течение как минимум 20 сут с интервалом 2–3 сут. Для каждой временной точки использовали три повторности (три колбы или три пробы, отобранные из биореактора, $n = 3$).

Жизнеспособность культур клеток определяли, используя прижизненный краситель феносафранин (0.1% раствор) либо 0.025% синьку Эванса, путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для каждой временной точки определение проводили в трех образцах, подсчитывая не менее 200 клеточных агрегатов в каждом образце.

По полученным результатам рассчитывали индекс роста (I) и удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ) по следующим формулам:

$$I = (X_{\max} - X_0)/X_0, \quad (1)$$

где $X_{\max}$ – максимальное содержание сухой биомассы в литре среды;

X_0 – начальное содержание сухой биомассы в литре среды;

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1), \quad (2)$$

где X_2 – содержание сухой биомассы в литре среды в момент времени t_2;

X_1 – содержание сухой биомассы в литре среды в момент времени t_1.

Фитохимический анализ биомассы суспензионной культуры клеток. Для качественного анализа вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток *A. persarum* использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ ЭР МС).

УЭЖХ ЭР МС анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон m/z 100–2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120°C, температура десольвации – 250°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 600 л/ч.

Условия хроматографического разделения: колонка ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, Ирландия), температура колонки – 40°C, скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Компоненты подвижной фазы: 0.1% (v/v) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (v/v) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). При выполнении всех анализов использовали градиентный режим элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, v/v): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15 → 30%, 5–15 мин – 30 → 38%, 15–15.5 мин – 38 → 45%, 15.5–23 мин – 45%, 23–23.5 мин – 45 → 95%.

Навеску измельченного растительного материала (70 мг) экстрагировали 3 раза в 1 мл 70% (v/v) водного этилового спирта в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин (Микроцентрифуга МЦФ, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 40°C). Полученный экстракт суспендировали в 1 мл 5% (v/v) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции (ТФЭ) Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл 5% (v/v) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 40°C. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрила и воды (1 : 1, v/v). Объем инжекции – 1 мкл.

Исследование антимикробной активности экстрактов из клеточной биомассы полученных суспензионных культур клеток. Для работ по первичному скринингу антимикробной активности использовали образцы сухой клеточной биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращиваемой в колбах. Образцы биомассы отбирали на 14 сут культивирования и высушивали до постоянного веса в токе воздуха при температуре 40–50°C.

Для получения экстракта в пробирку типа Фалькон помещали навеску 400–600 мг сухой массы клеток и добавляли 7 мл 70% этилового спирта. Экстрагировали в ультразвуковой ванне (УЗВ-12, Сапфир, Россия; рабочая частота – 35 кГц) в течение 30 мин при комнатной температуре. Центрифугировали в течение 15 мин при 2700 об/мин

на центрифуге ЦЛМН-Р10-01 “Элекон” (Россия). Упаренный остаток лиофильно высушивали, затем разводили дистиллированной водой до 2% прозрачного раствора.

Культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 выращивали на скошенном Триптиказо-соевом агаре (TSA, Liofilchem, США) при 37°C в течение 24 ч, смывали физиологическим раствором, доводя до концентрации 1×10^9 по стандарту мутности МакФарланда. Полученную суспензию объемом 100 мкл переносили в пробирки типа Эппендорф с 2 мл Триптиказо-соевого бульона (TSB, Liofilchem, США). Для культивирования *S. aureus* в TSB бульон добавляли 0.1% Tween 80 (Liofilchem, США). Пробирки с культурой инкубировали на термошейкере TS-10 (BioSan, Латвия) при температуре 37°C в течение 4 ч. Концентрацию выращенной биомассы в бульоне измеряли с помощью фотометра OD600 (Implen, Германия) и сравнивали с калибровочной кривой для определения концентрации клеток в бульоне. В качестве положительного контроля использовали суспензию в концентрации около 3×10^7 КОЕ/мл. Для получения отрицательного контроля полученную суспензию прогревали при 100°C в течение 10 мин. Для получения суспензии смешанных клеток, состоящей из 50% живых и 50% предположительно нежизнеспособных клеток, смешивали в одинаковых долях живые и мертвые клетки соответственно.

Для определения антимикробной активности объектов исследования методом проточной цитометрии по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa,* 10, 20 или 30 мкл приготовленного образца экстракта смешивали соответственно с 90, 80 или 70 мкл культуры с начальной концентрацией клеток 2.0×10^7 кл/мл для *S. aureus* и 2.8×10^7 кл/мл для *P. aeruginosa* и тщательно перемешивали пипетированием. Для положительного контроля вместо экстрактов биомассы добавляли соответственно 10, 20 или 30 мкл Триптиказо-соевого бульона (TSB, Liofilchem, США). Образцы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 3.5 и 20 ч.

Протокол анализа по истечении 3.5 часов инкубирования образцов в термостате с использованием набора реагентов LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Thermo Fisher Scientific, США) был следующим: 987 мкл 0.9% раствора натрия хлорида смешивали с 1.5 мкл готового раствора SYTO 9 и 1.5 мкл готового раствора PI, тщательно перемешивали, добавляли 10 мкл культуры, тщательно перемешивали, инкубировали в темных светозащитных эппендорфах (Axigen, США) в течение 15 мин, измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore, США).

Протокол анализа по истечении 20 ч инкубирования образцов в термостате с использованием набора реагентов LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Thermo Fisher Scientific, США) был следующим: 992 мкл 0.9% раствора натрия хлорида смешивали с 1.5 мкл готового раствора SYTO 9 и 1.5 мкл готового раствора PI, тщательно перемешивали, добавляли 5 мкл культуры, тщательно перемешивали, инкубировали в темных светозащитных эппендорфах (Axigen, США) в течение 15 мин, измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore, США).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения из 3 биологических повторностей (по 3 колбы или по 3 фиксированных объема биологического материала на точку) для каждого срока, пассажа и варианта культивирования. Стандартные отклонения менее 10% от величин средних значений на графиках не отображали. Бары на диаграммах соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95%-м уровне вероятности по *t*-критерию Стъюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение суспензионной культуры клеток

Для получения клеточной суспензии 300–400 мг каллусной культуры помещали в колбы объемом 0.25 л с 25 мл жидкой питательной среды и культивировали на орбитальном шейкере при 95–100 об/мин. Через 18–20 сут культивирования осуществляли пересев надосадочной фракции клеток, постепенно увеличивая степень разбавления от 1 : 2 до 1 : 8 (соотношение объема инокулята к объему свежей питательной среды) и сокращая цикл субкультивирования. В процессе получения суспензионной культуры клеток наблюдали интенсивное образование мелкой надосадочной фракции и быструю адаптацию культуры к новым условиям выращивания. Спустя 3 мес. с момента получения первичной клеточной суспензии (5 циклов субкультивирования), длина цикла субкультивирования составляла 14 сут при начальной плотности посадки 0.8–1.0 г/л по сухой массе клеток.

Динамика роста суспензионной культуры клеток при выращивании в колбах

Изучение ростовых показателей полученной суспензионной культуры клеток проводили при стандартном периодическом выращивании в колбах на качалке на 8 цикл субкультивирования после получения. Для подтверждения стабильности полученных результатов определение основных ро-

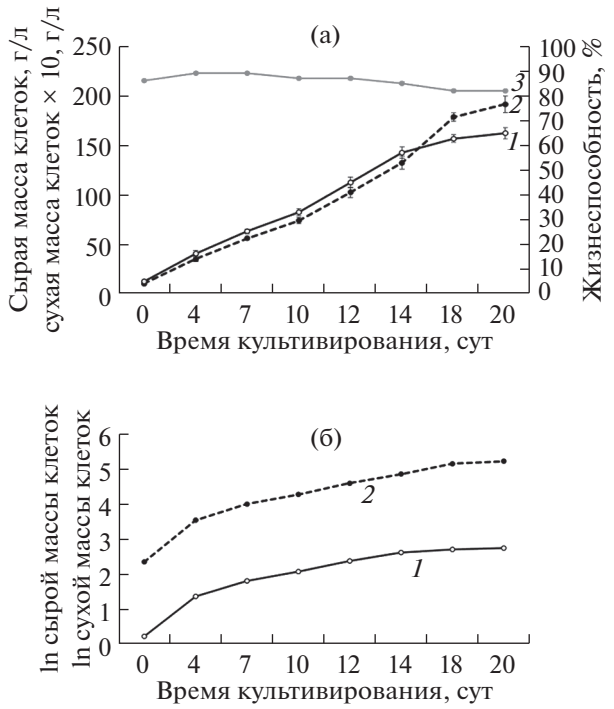

Рис. 1. Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в колбах объемом 250 мл (8 цикл субкультивирования): а – линейная система координат; б – полулогарифмическая система координат. *1* – сухая масса клеток; *2* – сырая масса клеток; *3* – жизнеспособность.

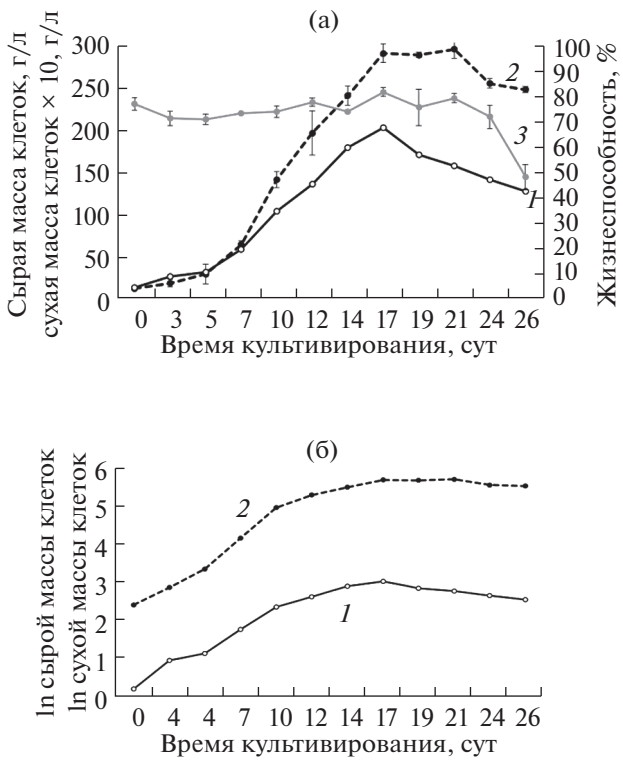

Рис. 2. Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в колбах объемом 250 мл (22 цикл субкультивирования): а – линейная система координат; б – полулогарифмическая система координат. *1* – сухая масса клеток; *2* – сырая масса клеток; *3* – жизнеспособность.

стовых характеристик повторяли через полгода (22 цикл субкультивирования). На основе полученных данных были построены кривые роста по сырой и сухой массе и жизнеспособности в нормальной и полулогарифмической системах координат (рис. 1, 2). Рассчитанные по полученным данным основные ростовые показатели представлены в табл. 1.

Исследуемая суспензионная культура клеток по степени агрегированности характеризовалась высоким уровнем гетерогенности, более 60% приходилось на агрегаты размером более 50 клеток. В течение первых 3 мес. субкультивирования также встречались очень крупные жизнеспособные агрегаты диаметром 2.5–5.0 мм. Количество жизнеспособных единичных клеток и мелких агрегатов (до 5 клеток) было незначительно. Агрегаты были представлены двумя типами клеток – меристемоидными и паренхимоподобными. Причем число последних увеличивалось к концу стационарной фазы цикла субкультивирования во всех вариантах. Форма агрегатов была преимущественно округлая.

Для исследуемой культуры (при контрольной начальной плотности посадки около 0.9–1.2 г/л по сухой биомассе клеток) цикл субкультивиро-

Таблица 1. Ростовые показатели суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в различных системах

Культура		M_{max_dw}, г/л	v, %	μ_{dw}, сут$^{-1}$	I_{dw}
Колбы	8 цикл субкультивирования	15.25 ±1.53	87.5 ± 4.22	0.15 ± 0.01	11.38 ± 0.40
	22 цикл субкультивирования	20.05 ± 2.12	75.1 ± 2.03	0.15 ± 0.01	15.85 ± 0.87
Биореакторы		13.71 ± 1.84	74.1 ± 2.16	0.12 ± 0.01	8.72 ± 0.72

Примечание: M_{max_dw} – максимальное значение накопления биомассы клеток по сухому весу; v – жизнеспособность клеток; μ – удельная скорость роста; I – индекс роста.

вания при определении ростовых характеристик составлял 20 и 26 сут на 8 и 22 циклы субкультивирования соответственно. Продолжительность лаг-фазы роста находилась в пределах 1–2 и 4–5 сут соответственно, фаза экспоненциального роста составила 9 – 10 сут для обоих вариантов. Стационарная фаза наступала на 14–16-е сут, фазу деградации удалось зафиксировать только для 22 цикла субкультивирования, начиная с 17 сут.

Следует отметить изменение характера ростовой кривой и некоторое повышение ростовых характеристик за 14 циклов выращивания культуры, в частности, увеличение на 20–25% индекса роста и уровня накопления биомассы клеток. Кроме того, к 22 циклу культивирования в культуре практически исчезли крупные агрегаты с диаметром 3 мм и более.

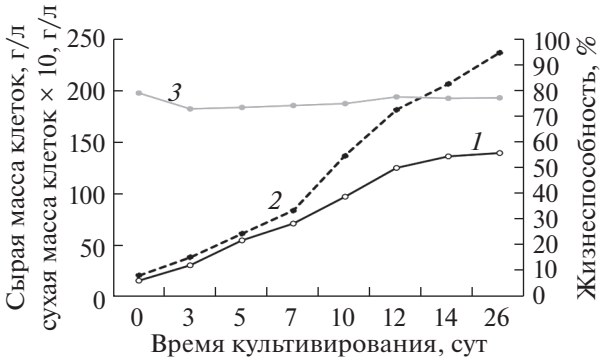

Рис. 3. Динамика роста суспензионной культуры клеток *A. persarum* при выращивании в 20 л барботажном биореакторе (линейная система координат). *1* – сухая масса клеток; *2* – сырая масса клеток; *3* – жизнеспособность.

Аппаратное культивирование суспензионной культуры клеток в периодическом режиме

С целью определения возможности аппаратного выращивания полученной суспензионной культуры клеток, было проведено периодическое культивирование в лабораторном барботажном биореакторе с рабочим объемом 15 л. Ростовые характеристики культуры при выращивании в биореакторах представлены в табл. 1 и на рис. 3.

Из полученных результатов следует, что общий характер роста исследуемой культуры клеток в аппарате данного типа при периодическом режиме был в целом сходен с характером ее роста в колбах. К концу цикла субкультивирования (на 16 сут) наблюдали некоторое снижение жизнеспособности клеток (в среднем до 74%), степени агрегированности и уровня максимального накопления клеточной биомассы (13.71 г/л по сухой массе клеток).

Изучение качественного состава вторичных метаболитов в полученной культуре клеток

С помощью УЭЖХ ЭР МС был проведен фитохимический анализ биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*. УЭЖХ ЭР МС проводили в режиме детектирования положительно-заряженных ионов, поскольку в этом режиме при электрораспылительной ионизации для многих природных соединений часто наблюдается фрагментация (с образованием характеристических осколочных ионов) уже в источнике ионизации [21]. Это позволяет проводить достаточно быструю структурную идентификацию метаболитов при ограниченном числе хроматографических разделений. Структурную идентификацию соединений проводили на основании расшифровки результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул в источнике ионизации), анализа относительного хроматографического поведения соединений и сопоставления этих результатов с данными литературы [22–24].

Результаты УЭЖХ ЭР МС идентификации вторичных метаболитов в экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum*, выращенной в колбах (12 сут культивирования, конец экспоненциальной фазы роста, начало стационарной фазы), представлены в табл. 2. Установлено, что в биомассе даннной культуры клеток присутствуют изофлавоны нескольких структурных типов: свободные изофлавоны (изомер метилированного изофлавона афформозина), глюкозиды изофлавонов (глюкозиды каликозина и формононетина) и ацилированные (малонилированные) глюкозиды изофлавонов (малонил-глюкозиды каликозина, формононетина, генистеина и изомера афформозина).

Исследование антимикробной активности экстрактов из клеточной биомассы полученных суспензионных культур клеток

Для проведения анализа на антимикробную активность комплексных экстрактов биомассы культур клеток *A. persarum* использовали проточную цитометрию. К культурам клеток патогенов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 добавляли экстракты *A. persarum* и инкубировали 3.5 и 20 ч. После соответствующей обработки (см. выше описание методики), измеряли популяции живых и мертвых клеток на проточном цитометре.

Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa* после 3.5 ч инкубирования приведены соответственно в табл. 3 и 4. Ингибирующий эффект по отношению к *S. aureus* наблюдали уже при добавлении 10 мкл экстракта, при этом эффект усиливался с повышением дозы экстракта

Таблица 2. Результаты УЭЖХ ЭР МС анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207sus, 12 сут выращивания в колбах)

t_R, мин*	Масс-спектры, *m/z***			Результаты идентификации
	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[Агликон+H]^+$	
2.04	447.1	469.1	285.1	Каликозин-7-O-Glc
2.81	533.1	555.1	285.1	Каликозин-7-O-Glc-O-Mal
3.32	431.1	453.1	269.1	Формононетин-7-O-Glc
3.54	549.1	571.1	301.1	Изомер диметоксиптерокарпана-3-O-Glc-O-Mal
4.19	517.1	539.1	269.1	Формононетин-7-O-Glc-O-Mal
4.68	547.1	569.1	299.1	Изомер афформозина-7-O-Glc-O-Mal
5.03	519.1	541.1	271.1	Генистеин-7-O-Glc-O-Mal
5.49	299.1	321.1	–	Изомер афформозина

Примечание: * – время удерживания на хроматографической колонке, мин; ** – данные масс-спектров (указаны значения *m/z* для обнаруженных ионов). Обозначения: Glc – остаток глюкопиранозы; Mal – остаток малоновой кислоты.

Таблица 3. Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Staphylococcus aureus* после 3.5 часов инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k + (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
	Кл × 10^7/мл				
10 мкл					
k+	16.96	16.90	0.06	–	0.36
+ A. persarum					
1.	6.79 ± 0.32	6.29 ± 0.32	0.46 ± 0.07	37.23 ± 1.92	6.92 ± 1.06
20 мкл					
k+	16.08	15.92	0.16	–	1.01
+ A. persarum					
2.	5.55 ± 0.11	4.90 ± 0.09	0.65 ± 0.04	30.78 ± 0.74	11.77 ± 0.58
30 мкл					
k+	14.47	14.14	0.33	–	2.31
+ A. persarum					
3.	4.43 ± 0.17	3.80 ± 0.18	0.63 ± 0.05	26.89 ± 1.34	14.19 ± 1.20

Примечание: k+ – положительный контроль.

Таблица 4. Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* после 3.5 часов инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k+ (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
	кл × 10^7/мл				
30 мкл					
k+	12.06	11.92	0.14	–	1.19
+ A. persarum					
1.	11.02 ± 0.55	10.92 ± 0.95	0.10 ± 0.03	91.64 ± 4.62	0.94 ± 0.32

Примечание: k+ – положительный контроль.

Таблица 5. Результаты исследования антимикробной активности образцов экстрактов по отношению к *Staphylococcus aureus* после 20 ч инкубирования

№	Всего	Живые	Мертвые	Живые клетки, % к k+ (жив)	Мертвые клетки, % от всего клеток
	кл × 10^7/мл				
10 мкл					
k+	18.80	18.02	0.78	–	4.15
+ *A. persarum*					
1.	10.83 ± 0.16	9.90 ± 0.10	0.93 ± 0.90	54.94 ± 0.94	8.55 ± 0.70
20 мкл					
k+	19.75	18.93	0.82	–	4.16
+ *A. persarum*					
2.	5.31 ± 0.52	4.21 ± 0.53	1.10 ± 0.02	22.24 ± 2.82	20.76 ± 2.37
30 мкл					
k+	19.72	18.81	0.91	–	4.61
+ *A. persarum*					
3.	3.96 ± 0.23	2.35 ± 0.08	1.61 ± 0.28	12.49 ± 0.44	40.45 ± 5.00

Примечание: k+ – положительный контроль

до 20 и 30 мкл (табл. 3). В то же время наблюдали отсутствие подавляющей активности в отношении *P. aeruginosa* даже после добавления 30 мкл экстракта (табл. 4). Исходя из этого, на долгосрочное инкубирование (20 ч) были оставлены только смеси экстрактов с *S. aureus*. Как видно из данных (табл. 5), антимикробная активность по отношению к *S. aureus* сохранилась после долгосрочного инкубирования. При этом, как и при 3.5 ч инкубирования, с повышением концентрации экстракта происходило усиление ингибиторной активности. Однако полного подавления роста бактериальной культуры не наблюдали ни в одном варианте.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы впервые была получена суспензионная культура клеток *A. persarum* и был проведен комплексный анализ ее ростовых показателей при выращивании в различных системах. Полученные результаты позволяют заключить, что полученная линия суспензионной культуры клеток *A. persarum* характеризуется интенсивным ростом. При этом основные ростовые характеристики при выращивании исследуемой культуры в биореакторах незначительно отличались от таковых при выращивании в колбах, что в перспективе делает возможным дальнейшее масштабирование процесса культивирования до биореакторов большего объема [18, 19]. Индекс роста, а также распределение и длительность ростовых фаз в цикле культивирования *A. persarum* в целом сходны с исследованными ранее суспензионными культурами клеток других видов, например, *Polyscias filicifolia* (C. Moore ex E. Fourn.) L.H. Bailey и *Dioscorea deltoidea* Wall. [18, 19], однако для культуры *A. persarum* характерны более высокие показатели накопления сухого и сырого веса.

Показано, что в культивируемых *in vitro* клетках сохраняется способность к образованию вторичных метаболитов. С использованием УЭЖХ ЭР МС установлено, что обнаруженные соединения относятся к группе изофлавонов. Это соответствует данным, полученным ранее для каллусных культур клеток [16]. Вторичные метаболиты, обнаруженные в культуре клеток *A. persarum* широко распространены среди растений семейства *Fabaceae* [25]. Однако у представителей рода *Alhagi spp.* изофлавоны встречаются сравнительно редко [15, 23]. В частности, в доступной литературе практически отсутствуют данные о наличии малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi* spp. Следует подчеркнуть, что в настоящей работе идентификация соединений выполнена на основе исключительно данных масс-спектрометрии. Для более строгого структурного описания обнаруженных соединений требуются дополнительные исследования.

Был проведен первичный скрининг антимикробной активности комплексных экстрактов из клеточной биомассы полученной суспензионной культуры клеток *A. persarum* с использованием тест-систем культур клеток золотистого стафило-

кокка *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *S. aureus* остается одним из важнейших возбудителей инфекций человека, вызывая широкий спектр заболеваний: от легких и средней тяжести поражений кожи и мягких тканей до угрожающих жизни пневмонии, сепсиса, септикопиемии и синдрома токсического шока [26]. *P. aeruginosa* – основной возбудитель псевдомонадных инфекций у человека и может входить в состав его нормальной микрофлоры. Она легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Целый ряд особенностей позволяет синегнойной палочке также лидировать по частоте возникновения и внутрибольничных инфекций [27].

В процессе поиска новых и совершенствования уже имеющихся средств подавления данных возбудителей исследователи все чаще обращаются к препаратам на растительной основе, а изоляты патогенов используются как тест-системы для определения антимикробной активности экстрактов лекарственных растений [28, 29]. Показано, что эффективность последних в качестве антимикробных средств может быть видоспецифична. Например, из препаратов 12 лекарственных растений только экстракты *Dacryodes edulis*, *Occimum gratissimum*, *Commelina erecta* и *Spilanthes filicaulis* проявляли ингибирующую активность в отношении как минимум 6 из 11 клинических изолятов *S. aureus* [29]. Метанольный экстракт (1%) ризома *Berginia ciliate* ингибировал формирование биопленки у *P. aeruginosa* (PAO1) более чем на 80% по сравнению с контролем, причем наблюдали положительную корреляцию ингибирующего эффекта и содержания в экстракте флавоноидов [30]. В нашей работе в результате проведенного первичного скрининга было показано, что экстракты культуры клеток *A. persarum* проявляли специфическую подавляющую активность к *S. aureus*, однако не проявляли ее по отношению к *P. aeruginosa*. Это может быть связано со специфичностью действия данного вида растений по отношению к грамположительным (*S. aureus*) микроорганизмам. Однако для подтверждения или опровержения этой теории и для получения более выраженного эффекта необходимы дальнейшие исследования, в частности – по подбору минимальных ингибирующих концентраций экстрактов культур клеток.

Исследования по получению культуры клеток, выращиванию в колбах, анализу вторичных соединений и антимикробной активности выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (договор № 18-54-06021 (Аз_а)). Работы по культивированию культуры клеток в биореакторах выполнены при поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1882). Все работы были проведены с использованием оборудования Уникальных научных установок “Опытный биотехнологический комплекс” и “Всероссийская коллекция культур клеток высших растений” на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alqasoumi S.I., Al-Rehaily A.J., Al Sheikh A.M. AbdelKader M.S.* Evaluation of the hepatoprotective effect of *Ephedra foliate, Alhagi maurorum, Capsella bursa-pastoris*, and *Hibiscus sabdariffa* against experimentally induced liver injury in rats // Nat. Prod. Sci. 2008. V. 14. P. 95.
2. *Naseri M.K.G., Mard S.A.* Gastroprotective effect of *Alhagi maurorum* on experimental gastric ulcer in rats // Pak. J. Med. Sci. 2007. V. 23. P. 570.
3. *Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S.* Antiinflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn) // Food Chem. Toxicol. 2010. V. 48. P. 2785.
4. *Neamah N.F.* A Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Alhagi maurorum* // Global Journal of Pharmacology. 2012. V. 6. P. 41.
5. *Marashdah M.S., Al-Hazimi H.M.* Pharmacological activity of ethanolic extract of *Alhagi maurorum* roots // Arab. J. Chem. 2010. V. 3. P. 39.
6. *Marashdah M.S., Farraj A.I.* Pharmacological activity of 2% aqueous acetic acid extract of *Alhagi maurorum* roots // J. Saudi Chem. Soc. 2010. V. 14. P. 247.
7. *Abu-Taleb A.M., El-Deeb K., Al-Otibi F.O.* Bioactivity of some plant extracts against *Drechslera biseptata* and *Fusarium solani* // J. Food Agric. Environ. 2011. V. 9. P. 769.
8. *Rahman S.M.A., Abd-Ellatif S.A., Deraz S.F., Khalil A.A.* Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 10733.
9. *Towhidi A, Zhandi M.* Chemical composition, in vitro digestibility and palatability of nine plant species for dromedary camels in the province of Semnan // Iran. Egypt J. Biol. 2007. V. 9. P. 47.
10. *Piri A., Palangi A., Eivazi P.* The determination of nutritive value of *Alhagi* by in situ and gas production techniques // Eur. J. Exp. Biol. 2012. V 2. P. 846.
11. *Muhammad G., Hussain M.A., Anwar F., Ashraf M., Gilani A.H.* Alhagi: a plant genus rich in bioactives for pharmaceuticals // Phytother. Res. 2015. V. 29. P. 1.
12. *Носов А.М.* Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro*. Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.

13. *Bharal S., Rashid A.* Tissue culture of *Alhagi camelorum* – a legume of high regenerative capacity // Physiol. Plant. 1981. V. 3. P. 497.
14. *Hassanein A.M., Mazen A.M.A.* Adventitious bud formation in *Alhagi graecorum* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2001. V. 65. P. 31.
15. *Dhaniya S., Parihar S.K.* In vitro callus induction and multiplication of inter-nodal explants in plants *Dicoma tomentosa* and *Alhagi maurorum* // J. of Drug Delivery and Therapeutics. 2019. V. 9. P. 212.
16. *Титова М.В., Кочкин Д.В., Соболькова Г.И., Фоменков А.А., Сидоров Р.А., Носов А.М.* Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – продуцентов флавоноидов // Биотехнология. 2020. Т.36. С. 35.
17. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. 1968. V. 50. P. 51.
18. *Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V.* Isoprenoid Production via Plant Cell Cultures: Biosynthesis, Accumulation and Scaling-Up to Bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. Paek K.-Y. Murthy H.N., Zhong J.-J. Netherlands: Springer, 2014. P. 563.
19. *Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M.* Features of respiration and formation of steroidal glycosides in *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture grown in flasks and bioreactors // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 557.
20. *Носов А.М.* Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. 2011. С. 386.
21. *Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A.* In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2011. V. 46. P. 478.
22. *Zhang J., Xu X.J., Xu W., Huang J., Zhu D.Y., and Qiu X.H.* Rapid characterization and identification of flavonoids in Radix Astragali by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry // J. Chromatogr. Sci. 2015. V. 53. P. 945.
23. *Lee Y.H., Kim B., Hwang S.-R., Kim K., Lee J.H.* Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α-glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems // Journal of Food and Drug Analysis. 2018. V. 26. P. 277.
24. *Zheng Y., Duan W., Sun J., Zhao C., Cheng Q., Li C., Peng G.* Structural identification and conversion analysis of malonyl isoflavonoid glycosides in *Astragali Radix* by HPLC coupled with ESI-Q TOF/MS // Molecules. 2019. V. 24. P. 929.
25. *Wink M.* Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae) //* S. Afr. J. Bot. 2013. V. 89. P. 164.
26. *Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // Jr. Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 28. P. 603.
27. *Hellen G.* Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. V. 16. P. 103.
28. *Ulloa-Urizar G., Aguilar-Luis M.A., De Lama-Odría M.C., Camarena-Lizarzaburu J., del Valle Mendoza J.* Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa //* Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2015. V. 5. P. 928.
29. *Sama Fonkeng L., Mouokeu R.S., Tume C., Njateng G.S., Kamcthueng M.O., Ndonkou N.J., Kuiate J.R.* Anti-*Staphylococcus aureus* activity of methanol extracts of 12 plants used in Cameroonian folk medicine // BMC Res. Notes. 2015. V. 24. P. 710.
30. *Alam K., Al Farraj D.A., Mah-e-Fatima S., Yameen M.A., Elshikh M.S., Alkufeidy R.M., Mustafa A.E.Z.M.A., Bhasme P., Alshammari M.K., Alkubaisi N.A., Abbasi A.M., Naqvi T.A.* Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen – *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Inf. Public Health. 2020.